

平成 30 年 4 月 27 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07025

研究課題名(和文) アクチン線維切断促進因子AIP1の一分子イメージングによる切断解析

研究課題名(英文) Single molecule kinetics analyses of AIP1-enhanced actin filament severing

研究代表者

辰巳 仁史 (Tatsumi, Hitoshi)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：20171720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の移動や形づくりに、そして細胞の力刺激に対する応答において、アクチン線維の分解とそれにつづく再重合が必須であることが知られている。アクチン線維の分解にはコフィリンに加えてAIP1が重要な役割を持つと推定されているが、その役割や仕組みは不明な点が多い。本研究は、アクチン線維にコフィリンが結合し、さらにAIP1が結合してコフィリンによる切断を促進するという仮説を検討する。そのために、アクチン線維、AIP1、コフィリンを蛍光ラベルし一分子可視化する。ライブイメージングにより、AIP1一分子がコフィリンの結合したアクチン線維に結合しアクチン線維の切断を促進していることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Rearrangement of actin filaments by polymerization, depolymerization, and severing, is important for many cellular functions. Cofilin and actin-interacting protein 1 (AIP1) are evolutionally conserved proteins. They cooperatively sever actin filaments. However, little is known about the biophysical basis of the actin-filament severing by cofilin and AIP1 proteins. We performed single molecule kinetics analyses of fluorescently labeled AIP1 during the severing process of cofilin-decorated actin filaments that was fluorescently labeled with a different color chromophore. Our results showed that binding of a single AIP molecule was sufficient to enhance filament severing and may follow the MM type kinetics.

研究分野：生物物理学

キーワード：アクチン線維 AIP1 cofilin 切断 一分子計測 近接場光 キネティクス 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

細胞の移動や形づくりに、そして細胞の力刺激に対する応答において、アクチン線維の分解とそれにつづく再重合が必須であることが知られている。アクチン線維の分解にはコフィリンに加えてAIP1が重要な役割を持つと推定されているが、その役割や仕組みは不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、アクチン線維、AIP1、コフィリンを蛍光ラベルし一分子可視化する。ライブイメージングにより、AIP1一分子がコフィリンの結合したアクチン線維に結合しアクチン線維の切断を促進していることを示しAIP1のアクチン線維切断における役割と仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

コフィリンの存在下で一本のアクチン線維にAIP1一分子が結合しアクチン線維の切断が起きるまでの分子の動きを低雑音近接場蛍光学顕微鏡 (TIRF) でタイムラプスイメージング (30ms 間隔) を行い、その画像分析する。

一分子観察のためにAIP1は緑の蛍光色素 Alexa488 でラベルする。ローダミンを結合したアクチン分子、ビオチン化アクチンを含むアクチンモノマーを重合させてアクチン線維を得る。抗ビオチン抗体をカバーガラスにつけ、アクチン線維をとびとび状にカバーガラスに固定する。このようにして用意したアクチン線維はガラスの表面で揺らいでおり、コフィリンやAIP1が溶液中と同様に結合することを確認した。

アクチン線維、AIP1、コフィリンを蛍光ラベルし、近接場蛍光顕微鏡 (TIRF) でイメージングすることで、アクチン線維一本とAIP1一分子を可視化する。その画像を低ノイズ CCD カメラでタイムラプス撮影する。その画像から、AIP1一分子がコフィリンを結合したアクチン線維一本に結合し、その後、アクチン線維が切断されることを画像として捉える。このデータからAIP1一分子(あるいは複数分子)がコフィリンによる切断を促進していることを示す。また切断の後のAIP1の振る舞いを分析することで、切断後アクチン線維の切断端にAIP1が結合する可能性を検討する。

4. 研究成果 a

ライブイメージングにより、AIP1一分子がコフィリンの結合したアクチン線維に結合しアクチン線維の切断を促進していることを示すことができた。詳しい解析を行うとAIP1の結合部位は観察用のガラスの表面にアクチン線維を固定した部位とアクチン線維の揺らぎが増加する部位の境目の場所であった。これらの結果からアクチン線維切断におけるAIP1の役割と仕組みの一部を明らかにすることができた。

これまでに成功した一分子観察の例では興味深いことにAIP1は切断されたアクチン線維の先端部に結合している。その後、AIP1はアクチン線維から解離した。このように、AIP1の一分子結合、短い時間(1s程度)での切断、切断端への結合(キャッピング)と解離を一分子レベルで調べることができた。上記の1sの結合時間からAIP1が約10倍の切断促進作用を持つことが分かった。

AIP1一分子が切断を促進していることをAIP1の明るさの変化を通して分析した。多くの例ではAIP1一分子がアクチン線維に結合して切断を促進した。もしAIP1の複数分子が結合に関与している場合には、複数の明るさのレベルが階段状に観察される。その場合、複数個のAIP1結合による切断のキネティクスの変化(例えば切断時間が短いなど)を検討した。そこから複数のAIP1の結合がおき、相互作用による切断の増強は観察されなかった。AIP1が互いに近傍に結合する可能性があるため、複数AIP1分子の結合を超高解像イメージングする(分解能18nm)。コフィリンの場合、近傍への結合はおそらくコフィリンの切断活性を生み出す機構であり(Hayakawa et al., 2014)同様の機構がAIP1でも見つかる可能性があるが現在はまだ検討を行っていない。

さらに本研究ではコフィリンとAIP1の二重蛍光測定を行って、アクチン線維に結合したコフィリンの集団にAIP1が結合することで、アクチン線維の切断が促進することを示すことができた。

アクチン線維の切断の分子的な反応過程の詳細は現在も不明である。これまでのXieたちの先駆的な研究(Xie, et al., 1999)から一分子反応を記述するミ

カエリスメンテン (MM) 型反応式が知られている。そこで、AIP1 一分子の切断促進反応が MM 型の反応方程式に当てはまるかどうかを検討する。AIP1 の結合から切断までの時間を測定して分析した。MM 型の反応に従うならば、AIP1 の結合と活性化の時間、および切断促進に時間が掛かるため、Ts は単純な指数分布をするのではなく、結合の時間と切断促進 (活性化) の時間を加味した 2 つの指数分布関数の合計であらわされると推定される。実際の測定では 2 つの時定数を決定する分解能を達成することは現時点ではできていない。現時点では一つの時定数で記述することができた。

この切断の活性化に必要なエネルギーはアクチン線維の局所的な曲げ (キック) によって供給されるという仮説を検証するために、切断点におけるアクチン線維のキックの角度を分析する。AIP1 による切断の活性化エネルギーの減少が予想されるので、小さい角度のキックで切断が起きる可能性があり、キック角の分布を分析した。

この現象はキャッピングと呼ばれて、我々は近傍にある 2 つの切断端が再びつながる現象 (アニーリングと呼ばれる) を阻害していると考えている。断端に AIP1 が結合している場合と結合していない場合を比較して、キャッピングによるアニーリングの阻害を検討したが、画像分析を行うには切断点の揺らぎの速度が速すぎて、分析は十分に行うことができなかった。

細胞レベルの実験から、AIP1 のアクチン線維に対する結合あるいは切断活性は、アクチン線維の張力に依存して制御されている可能性が高い。そこで、アクチン線維の内在張力を変化させつつ、AIP1 の結合頻度の変化を調べることは今後の課題として残された。

これらの成果は現在論文にまとめて投稿中である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1 .Nomura, K., K. Hayakawa, H. Tatsumi,

and S. Ono. 2016. Actin-interacting Protein 1 Promotes Disassembly of Actin-depolymerizing Factor/Cofilin-bound Actin Filaments in a pH-dependent Manner. *The Journal of biological chemistry*. 291:5146-5156. DOI 10.1074/jbc.M115.713495

2 . 総説 アクチン線維は張力を感じ、コフィリンとの相互作用を介して細胞骨格の動態を制御するメカノセンサーである 著者名 (辰巳仁史、早川公英、曾我部正博) 所属名 (名古屋大学院医学系研究科) 日本生物物理学会誌 2015 年 vol.55, pp187-191 DOI: 10.2142/biophys.55.187

[学会発表](計 5 件)

1 . The actin filament as a tension sensor Hitoshi TATSUMI (Invited) Kanazawa Institute of Technology, Japan
3rd International Symposium on Mechanobiology ISMB 2017 December 13, (December 11-14), 2017 University Town Auditorium National University of Singapore

2 . 演題番号 1SIA-5 Measurement of ciliary movement using SQUID gradiometer and a small neodymium magnet piece SQUIDとネオジウム磁石片を用いて、繊毛運動を測定する 牧島 亮太 1, 小山 大介 2, 河合 淳 2, 辰巳仁史 1 (1 金沢工業大学大学院 工学研究科 バイオ・化学専攻, 2 金沢工業大学 先端電子技術応用研究所) 2017/09/19 (火) 09:00~11:30 I会場 日本生物物理学会 題55回年会

3 . Increase in the Cytoplasmic Free Calcium Ion Concentration in Response to Changes in the Gravity Vector in Arabidopsis Seedlings Hitoshi Tatsumi*, Masataka Nakano, Masatsugu Toyota, Hidetoshi Iida, Masahiro Sokabe, Takuya Furuichi AMS2016 11th Asian microgravity symposium, Sapporo Japan. October 27 Hokkaido University

4. 物細胞の重力反応とその分子機構の推定 辰巳 仁史 日本宇宙生物科学会第30回大会 日時 2016/10/14 場所 愛知医科大学

5. Analysis of fluctuations of a single actin filament that works as a tension sensor

アクチン線維が負の張力センサーとして働く仕組みを分子イメージングから解明する試み 辰巳 仁史 1 (1 金沢工業大学・バイオ・化学部・応用バイオ学科) Hitoshi Tatsumi 1 (1 Department of Applied Bioscience, Kanazawa Institute of Technology (KIT)) シンポジウム [Symposium] ナノ計測技術とバイオイメージング技術の融合が開く単一細胞計測の新展開 生物物理学会 55 回年会 熊本大学 2017 年 9 月

〔図書〕(計 4 件)

1. 研究者が教える動物実験 35 章 筋を動かす信号、筋の長さを知らせる信号、田中基樹 辰巳仁史 出版社共立出版 2015 年 pp 141-146

2. メカノバイオロジー 辰巳仁史 早川公英 19 章 細胞・細胞器官・分子への機械刺激と機能測定 pp. 227-242 2015 年 7 月 株式会社化学同人

3. 知りたいものは“状態”ではないか？ 辰巳仁史、中山人間科学振興財団25周年記念報告集 “25年の歩み” p.115 - 116 2016年出版 出版：中山書店

4. 超高解像度光学顕微鏡の革新とアクチン線維切断分子コフィリンの結合の分析 辰巳仁史、中谷医工計測技術振興財団 研究開発報告書 印刷予定

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kitnet.jp/laboratories/lab0179/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

辰巳 仁史 (Tatsumi Hitoshi)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授
研究者番号：20171720

(2)研究分担者

早川 公英 (Hayakawa Kimihide)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・その他

研究者番号：60467280

飯田 秀利 (Iida Hidetoshi)

東京学芸大学・教育学部・名誉教授
研究者番号：70124435

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()